维普资讯 http://www.cqvip.com

19866(13)

58,72,78

动 物 学 研 究 1997. 18（1）：58，72，78 CN 53-1040 Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

一种从鱼类卵巢制备地高辛标记 mtDNA 探针的简易方法*

A SIMPLE METHOD FOR GETTING DIGOXIGENIN LABELING PROBLE OF mtDNA FROM OVARY OF FISH

鲤鱼，卵巢；

肖武汉，张亚平

Q959.4

关键词 鱼类，线粒体 DNA，地高辛标记
Key words Fish，mtDNA，Digoxigenin labeling

线粒体 DNA 限制性片段长度多态性（RFLP）分析，已被广泛地应用于动物的系统进化和遗传多样性研究，取得了许多有意义的结果。线粒体 DNA RFLP 分析一般有两条途径：一是从动物组织中提取 mtDNA 后，酶切，紫外灯下观察，或放射性自显影。这要求所提取的 mtDNA 量足够多，或纯度相当高；二是将基因组 DNA 酶切后，用 mtDNA 探针进行 Southern 杂交。该途径不需要专门提纯 mtDNA，特别适合于微量 mtDNA 的 RFLP 分析。进行 Southern 杂交分析，关键在于要有高质量的探针。用于制备探针的 mtDNA，纯度要求较高，一般采用氯化铯密度梯度离心或制备 mtDNA 克隆等方法获得。这些方法，不仅操作步骤繁锁，而且设备条件要求高，在一般实验室难以实施。

我们在进行鱼类 mtDNA RFLP 分析时，发现鱼类内脏和肌肉组织 mtDNA 含量较低，特别对于一些小型鱼类，能获得的 mtDNA 很少，无法进行足够的酶切分析。但是，从鱼类卵巢可分离制备较多的 mtDNA，经进一步电泳纯化后，可制成纯度较高的地高辛标记 mtDNA 探针。我们建立了一种利用鲤鱼卵巢组织制备鱼类 mtDNA 地高辛标记探针的方法，该方法具有简便、经济、灵敏度高的特点。

1 材料和方法

1.1 材料

鲤鱼（*Cyprinus carpio*）购自昆明市圆西路市场，取其卵巢组织、称重。

1.2 方法

1.2.1 mtDNA 的提取 参照王文等（1993）改进的方法进行。

1.2.2 mtDNA 纯化 （1）用 0.8% 的琼脂糖凝胶检测提取的 mtDNA，若无严重的核 DNA 污染，继续下一步工作。（2）加入 RNaseA，使终浓度为 40 μg/ml，37℃ 作用 2—3 h；加入 1/2 体积饱和酚，室温下手摇振荡 15 min，加与酚等体积的氯仿/异戊醇（24：1）充分混匀，12000 r/min 离心 10 min；取水相，加入 1/10 体积 5 mol/L NaCl，2 倍体积无水乙醇，混匀，-20℃ 放置 2 h 以上，12000 r/min 离心 10 min；用 70% 冷乙醇洗涤沉淀，12000 r/min 离心 8 min；37℃ 充分干燥，加适量 TE 溶解。

1.2.3 mtDNA 单切点酶酶解 选择在鲤鱼 mtDNA 上只有一个切点的酶：*Pst* I。将 mtDNA 分装至 Eppendorf 管中，加入 *Pst* I（1 u/1μg）和相应的缓冲液，37℃ 消化 6—8 h。

（下转第 72 页）

* 中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室基金和中国科学院分类区系特别支持费资助课题

本文 1996 年 4 月 14 日收到，同年 4 月 18 日修回

维普资讯 http://www.cqvip.com

（上接第58页）

1.2.4 mtDNA 的进一步纯化 制备琼脂糖凝胶（0.8%），在距点样孔 1.5 cm 左右的位置，挖出一宽为 1 cm 左右的琼脂糖块，倒入低熔点琼脂糖凝胶（0.8%）；每个点样孔加入 20 μl 的酶切 mtDNA，1.5 V/cm 电压，电泳 12—16 h。紫外灯下检测，当发现 mtDNA 进入低熔点琼脂糖后，停止电泳；紫外灯下切下含 mtDNA 的低熔点琼脂糖凝胶，加入适量 TE，使总体积为 500 μl。69℃水浴 15 min，熔化琼脂糖，加入 500 μl 饱和酚，迅速摇动，室温下振荡 15 min，12000 r/min 离心 10 min。取水相，加入 500 μl 氯仿-异戊醇（24∶1），振荡 10 min，12000 r/min，离心 8 min。取水相，加入 1/10 体积 5 mol/L NH_4Ac、2 倍体积无水乙醇，-70℃放置 1 h 以上，12000 r/min，离心 8 min，37℃充分干燥，加入适量 TE 溶解。

1.2.5 mtDNA 的双酶解 选择在鲤鱼 mtDNA 上共具有 12 个切点，且所切片段大小较为一致的两种酶：*Hind*Ⅲ、*Hae*Ⅲ，对纯化后的 mtDNA 进行双酶解。沉淀回收酶解产物。

1.2.6 mtDNA 的地高辛标记和 Southern 杂交分析 地高辛标记检测试剂盒、尼龙膜均购自 Boehringer-Mannheim 公司，限制性内切酶 *Eco*RⅤ购自华美生物公司。标记和检测操作按该公司的核酸标记和检测试剂盒中推荐的方法进行。

2 结果与讨论

鲤鱼、宜宾鲴（*Xenocypris fangi*）、草鱼（*Ctenopharyngodon idellus*）、银鲴（*X. argentea*）、湖北圆吻鲴（*Distoechodon hupeinensis*）基因组 DNA 和 mtDNA，经 *Eco*RⅤ酶切后，与鲤鱼地高辛标记 mtDNA 进行 Southern 杂交后，得到图谱如图 1。

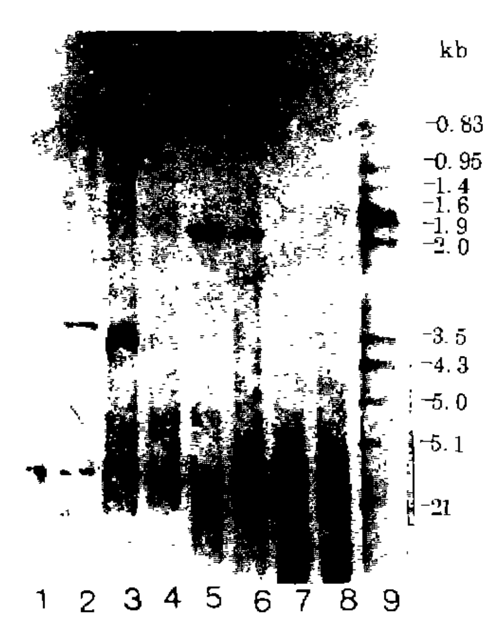


图1 五种鱼基因组 DNA 和 mtDNA 经 *Eco*RⅤ消化后，Southern 杂交图谱

Fig.1 Southern blot patterns of genomic DNA and mtDNA in five species of fish digested by *Eco*RⅤ

1：湖北圆吻鲴基因组 DNA（GDNA of *D. hupeinensis*）；2：银鲴线粒体 DNA（mtDNA of *X. argentea*）；
3：银鲴基因组 DNA（GDNA of *X. argentea*）；4：草鱼基因组 DNA（GDNA of *C. idellus*）；
5：宜宾鲴 mtDNA（mtDNA of *X. fangi*）；6：宜宾鲴基因组 DNA（GDNA of *X. fangi*）；
7：鲤 mtDNA（mtDNA of *C. carpio*）；8：鲤基因组 DNA（GDNA of *C. carpio*）；
9：λDNA/*Eco*RⅠ/*Hind*Ⅲ.

（下转第78页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

(上接第 72 页)

基因组 DNA 与相应鱼种 mtDNA 酶切后的杂交图谱完全一致，且背景小，说明所制备的探针，不仅在鲤科鱼类具有通用性，而且纯度高。

*Eco*RⅤ 在鲤 mtDNA 无切点，但在宜宾鲴、草鱼、银鲴、和湖北圆吻鲴 mtDNA 上均有两个切点，分别切成 14.67 和 1.9 kb，15.92 和 0.65 kb，13.37 和 3.2 kb，13.27 和 3.3 kb 两个片段。

制备 mtDNA 探针，首先必须得到大量的 mtDNA，并尽量减少核 DNA 的污染。不同的动物组织 mtDNA 含量和酶系统的活性很不相同，因此选择适当的组织，对于得到大量 mtDNA 和减少核 DNA 污染至关重要。在鱼类，作者发现卵巢组织，不仅 mtDNA 含量高，而且在提取 mtDNA 过程中，不易受到核 DNA 的污染。

鱼类 mtDNA 与其他脊椎动物 mtDNA 一样，为共价闭合环状，能形成超螺旋结构，在电泳时，常分开为两条带，这给低熔点琼脂糖回收带来一定困难。我们选择在鲤鱼 mtDNA 上只有一个切点的酶 *Pst* Ⅰ，将其酶解成线状。在回收时，线状 mtDNA 被压缩成一条很窄的带，这不仅给纯化回收带来方便，而且提高了回收率。在用低熔点琼脂糖回收的 mtDNA 中，微量低熔点琼脂糖的存在，对后续的标记反应具有很大的抑制作用，因此，在回收过程中，加入苯酚前，一定要等到低熔点琼脂糖完全溶化，加入苯酚后应快速上下摇动，以使其能在瞬间变为极细的粉末状，并尽可能避免低熔点琼脂糖的吸入。

在标记反应中，DNA 分子要得到有效标记，必须为线状，并且片段大小在 100—1000 bp 之间。大于 10 kb 的片段难以标记上。在鲤鱼的 mtDNA 上，*Hind*Ⅲ 和 *Hae*Ⅲ 能将其切成 12 个较为均一的片段。我们选择这两种酶对鲤鱼 mtDNA 进行酶解后，再进行标记，为得到高质量的鱼类 mtDNA 地高辛标记探针提供了保证。

肖武汉[1,2]　　宿　兵[1]　　吴春花[1]　　张亚平[1]

(Xiao Wuhan[1,2]　　Su Bing[1]　　Wu Chunhua[1]　　Zhang Yaping[1]

(1 中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室　昆明　650223)

(1 *Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kuming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kuming*　650223)

(2 中国科学院水生生物研究所　武汉　430072)

(2 *Institute of Hydrobiology, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan*　430072)